



亚精胺抑制核糖体DNA转录

许银丰^{1*}, 万伟^{2*}

1. 湖南第一师范学院基础生物学实验室, 长沙 410205;

2. 浙江大学医学院生物化学系, 杭州 310058

* 联系人, E-mail: yinfeng_xu0824@126.com; wanwei@zju.edu.cn

2024-01-08 收稿, 2024-02-26 修回, 2024-03-13 接受, 2024-03-14 网络版发表

国家自然科学基金(31970694, 32370795)、湖南省自然科学基金(2022JJ30186)、湖南省科技创新计划(2022RC1171)和长沙市杰出创新青年培养计划(kq2305022)资助

摘要 核糖体是细胞内合成蛋白质的唯一细胞器, 主要由核糖体RNA (ribosomal RNA, rRNA)和核糖体蛋白组装形成。rDNA转录生成rRNA在细胞内的核仁处完成, 是核糖体生物发生的重要限速步骤之一。在正常细胞内, 核糖体DNA (ribosomal DNA, rDNA)的转录活性受到营养状态的严密调控。而在癌细胞内, 癌基因的激活、抑癌基因的失活和生长相关信号通路的失调等多种不同的机制均可导致rDNA的转录绕过营养状态的控制。癌细胞内异常激活的rDNA转录是癌细胞快速生长、增殖的必要前提, 也是癌细胞的共有特征之一。抑制癌细胞内异常激活的rDNA转录有望开发出新的抗癌药物。我们既往的研究揭示, 肿瘤蛋白p53诱导核蛋白2 (tumor protein p53 inducible nuclear protein 2, TP53INP2)的核仁定位是其促进rDNA转录的重要前提, 可用来指示细胞内的rDNA转录活性。本研究发现, 天然活性成分亚精胺可抑制TP53INP2的核仁定位, 并显著降低细胞的rDNA转录活性。机制研究表明, 亚精胺可抑制蛋白激酶雷帕霉素靶蛋白复合物1 (mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1)的必需亚基Raptor的乙酰化并降低细胞内mTORC1的活性, 进而抑制rDNA的转录。功能研究揭示, 亚精胺可显著抑制蛋白的合成和细胞的增殖。本研究提示, 抑制细胞内的rDNA转录活性可能是亚精胺发挥抗癌作用的重要机制之一。

关键词 癌症, mTORC1, rDNA转录, 核糖体生物发生, 亚精胺

核糖体是细胞内合成蛋白质的场所, 由60S和40S两个大小亚基组成, 核糖体亚基的主要成分包括核糖体RNA (ribosomal RNA, rRNA)和核糖体蛋白。核糖体生物发生是细胞内重要的合成代谢途径之一^[1]。核仁(nucleolus)是真核细胞内核糖体生物发生的主要场所, 包括rRNA的合成、剪切和加工, rRNA和核糖体蛋白组装成核糖体的大小亚基等过程均在核仁处完成^[2,3]。组装完成的核糖体大小亚基随后被转运至细胞质中进一步组装成完整的有功能的核糖体。哺乳动物细胞的核糖体DNA (ribosomal DNA, rDNA)在核仁处呈现串联重复的排列方式, 单个细胞一般包含成百上千个

rDNA拷贝。rDNA转录生成rRNA是核糖体生物发生的关键限速步骤之一。

在正常细胞内, rDNA的转录活性受到营养状态的严密调控。然而, 在多种癌细胞内, rDNA转录可绕过营养状态的控制, 维持异常活跃的状态, 进而促进癌细胞持续快速的生长和增殖^[4-6]。rDNA转录的异常激活也是癌细胞的共有特征之一^[4-6]。目前的研究发现, 多种不同的机制可导致癌细胞中的rDNA转录异常激活。多个促进rDNA转录的蛋白激酶, 包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERKs)和雷帕霉素靶蛋白复合物1 (mechanistic target of rapamycin

引用格式: 许银丰, 万伟. 亚精胺抑制核糖体DNA转录. 科学通报, 2024, 69: 2072–2080

Xu Y F, Wan W. Spermidine inhibits rDNA transcription (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 2072–2080, doi: [10.1360/TB-2024-0037](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0037)

complex 1, mTORC1)在癌细胞中通常拥有更高的活性^[7-9]。此外,包括c-Myc在内的癌基因可显著提高rDNA的转录活性,而包括Rb和p53在内的抑癌基因则发挥抑制作用,癌基因的激活或者抑癌基因的失活也是引起癌细胞中rDNA转录异常激活的重要原因^[10-14]。

亚精胺(spermidine)是多胺成员中的一种天然活性成分,最初从精液中分离而来,也存在于小麦、大豆和多种坚果等植物成分中。在食物中补充亚精胺可以延长酵母、线虫、果蝇和小鼠等多种模式生物的寿命^[15-17]。而且,高亚精胺摄入与低死亡率之间的相关性独立于年龄、性别和体重指数等指标,表明亚精胺具有广泛的改善健康的作用^[18,19]。此外,流行病学数据显示,亚精胺可降低癌症相关的总死亡率,表现出一定的抗癌特性^[18]。目前的研究表明,亚精胺可能通过干扰癌细胞的细胞周期和调节机体的抗肿瘤免疫等不同的机制达到抑制癌细胞生长、增殖的目的^[20-22]。然而,亚精胺是否能够通过影响癌细胞其他的生物学过程调控癌细胞的生长、增殖并不明确。

本研究通过筛选新的调控rDNA转录活性的小分子,发现亚精胺为潜在的rDNA转录抑制剂。研究显示,亚精胺可显著降低细胞内mTORC1的活性,抑制rDNA转录生成rRNA,进而抑制蛋白的合成和细胞的增殖。本研究发现为亚精胺的抗癌活性提供了一条新的作用机理。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和稳定细胞系构建

将HeLa细胞培养于含有10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的高糖DMEM培养基中,置于37℃、含5% CO₂的恒温培养箱内培养至对数生长期且适宜密度时用于后续实验。根据Lipofectamine 3000说明书,进行质粒瞬时转染。细胞瞬时转染完成后,使用G418进行筛选,生成稳定表达携带GFP标签的肿瘤蛋白p53诱导核蛋白2 (tumor protein p53 inducible nuclear protein 2, TP53INP2)的HeLa细胞系。

1.2 试剂和处理

亚精胺(S2501)、姜黄素(C1386)、5-FUrd (F5130)和雷帕霉素(R8781)来自Sigma-Aldrich, H₂O₂ (7722-84-1)来自阿拉丁。化学试剂主要溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,化学品的使用浓度如下:亚精胺,

100 μmol/L;姜黄素,10 μmol/L;5-FUrd,2 mmol/L;雷帕霉素,250 nmol/L;H₂O₂,100 μmol/L。

1.3 抗体

使用如下抗体:生物素(biotin)抗体(Abcam, ab53494)、S6K1抗体(Cell Signaling Technology, 9202)、磷酸化S6K1抗体(Thr389) (Cell Signaling Technology, 9205)、泛乙酰化抗体(Cell Signaling Technology, 9441)、Raptor抗体(Cell Signaling Technology, 2280)、BrdU抗体(Sigma-Aldrich, B8434)、GAPDH抗体(Santa Cruz, SC-32233)、驴抗兔IRDye800CW二抗(LI-COR Biosciences, 926-32213)、驴抗鼠IRDye680二抗(LI-COR Biosciences, 926-68072)和Alexa Fluor 488荧光二抗(Thermo Fisher Scientific, A-11001)。

1.4 蛋白印迹

取生长状态良好的HeLa细胞,接种于6孔细胞培养板中,培养一定时间后,提取总蛋白。配制适当浓度的SDS-PAGE胶,等质量上样,电泳、转膜,将PVDF膜放入含有5%牛血清白蛋白的TBST缓冲液(150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5和0.1% Tween-20)中室温封闭2 h。封闭完成之后,利用合适的一抗于4℃孵育PVDF膜过夜, TBST缓冲液洗3次,每次10 min,利用合适的二抗室温避光孵育PVDF膜1 h, TBST缓冲液洗3次,使用Odyssey荧光扫描系统,选择适当的扫描强度,对目的条带进行扫描、分析。最后,使用Image J软件分析蛋白条带的灰度值。

1.5 蛋白免疫共沉淀

利用含有蛋白酶抑制剂的NP-40缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10%甘油)裂解细胞。在细胞裂解液中加入Raptor抗体于4℃孵育过夜,然后加入蛋白A琼脂糖珠于4℃继续孵育4 h,利用NP-40缓冲液洗涤琼脂糖珠4次,最后利用蛋白印迹实验分析结合于琼脂糖珠的蛋白。

1.6 免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜成像

取对数生长期的细胞重悬后加入预先放置玻片的24孔细胞培养板中,置于37℃、含5% CO₂的恒温培养箱内培养24 h,在细胞培养基内加入5-FUrd孵育,15 min后弃去培养基, PBS (phosphate-buffered saline)

缓冲液洗涤2次, 4%多聚甲醛固定10 min, 利用2 mol/L 盐酸处理并用硼酸钠中和, PBS缓冲液轻轻漂洗3次, 利用含有10%胎牛血清的PBS缓冲液室温封闭20 min, 利用含有0.1%皂苷(saponin)的BrdU抗体(含有10%胎牛血清的PBS缓冲液配置)于室温孵育对应的细胞2 h, PBS缓冲液漂洗3次后, 利用含有0.1%皂苷的相应二抗(含有10%胎牛血清的PBS缓冲液配置)于室温在避光环境下继续孵育对应的细胞1 h, PBS缓冲液漂洗4次, 利用指甲油封片. 所有图像均利用激光共聚焦显微镜 (LSM880, Carl Zeiss)采集、分析.

1.7 RNA提取和实时荧光定量PCR

利用Trizol试剂(Thermo Fisher Scientific, 15596018)提取细胞总RNA, 然后按照说明书利用M-MLV逆转录酶(Promega, 9PIM170)进行反转录, 反转录引物为随机引物. 使用SYBR GREEN PCR Master Mix (Takara, DRR041A)在10 μ L反应混合物中进行实时荧光定量PCR实验. PCR反应混合物包括以下组分: 10 pmol/L引物, 2 mmol/L $MgCl_2$, 200 μ mol/L dNTP混合物, 0.1 U Taq DNA聚合酶和通用缓冲液. 反应条件如下: 95°C 30 s; 40个循环, 95°C 10 s, 60°C 30 s. 每个样品设置5个复孔, 重复3次. 所使用的引物序列见表1.

表 1 荧光定量PCR实验使用的引物序列

Table 1 Primers used for real-time PCR assay

Name	Type	Sequence 5'→3'
47S rRNA	Forward	TGTCAGGCGTTCTCGTCTC
	Reverse	GAGAGCACGACGTCACCAC
ACTB	Forward	TTGCGTTACACCCTTTCTTG
	Reverse	CACCTTCACCGTTCCAGTTT

表 2 RNA印记实验使用的探针序列

Table 2 Probes used for northern blot analysis

Name	Sequence 5'→3'
47S rRNA	CGGGAGAGCACGACGTCACCACATCGATCACGAAGA GCCCCCGGGAGCGGAGGCCGGCCGGCCGGCCAGCG AGCCGATCGGCTCCGGCCAACCCCCCACTCCGGGGA AGGGGCGGCGGACAACCCCGCGGAGACGAGAACGCC TGACACGCAC
	CTGTACCTTCACCGTTCCAGTTTTTAAATCCTGAG TCAAGCCAAAAAAAAAAAAAAAAACCAAAACAAAACA AAAAAAACAAATAAAGCCATGCCAATCTCATCTTGT TTTCTGCGCAAGTAGGTTTTGTCAAGAAAGGGTGT AACGCAACTA

1.8 RNA印迹

利用琼脂糖凝胶分离细胞内的总RNA, 并将其转移到尼龙膜(Millipore, INYC00010), 利用生物素标记的人47S rRNA反义序列的探针和人ACTB mRNA反义序列的探针进行杂交, 最后用生物素抗体检测47S rRNA和ACTB mRNA. RNA反义序列的探针序列见表2.

1.9 新生蛋白合成和细胞增殖检测

细胞内新生蛋白合成速率采取Click-iT HPG Alexa Fluor 488蛋白合成方法进行测定, 根据试剂盒(Thermo Fisher Scientific, C10428)的说明书进行相应操作. 细胞增殖速率根据细胞计数试剂盒(Bimake, B34302)的说明书进行检测.

1.10 细胞活力检测

细胞的活力利用Annexin V/PI染色法进行检测. 利用亚精胺和 H_2O_2 分别处理细胞指定的时间, 弃细胞培养基并收集细胞, PBS缓冲液洗涤后重悬细胞, 加入Annexin V和PI以及染色缓冲液, 避光孵育30 min, 利用流式细胞仪进行检测.

1.11 统计分析

所有统计数据均以平均值±标准误差表示。数据差异比较使用Student's *t*-test法进行检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 亚精胺抑制细胞内GFP-TP53INP2的核仁定位

在既往的研究中, 我们发现核仁处的TP53INP2蛋白通过促进转录起始复合物在rDNA启动子区的组装激活细胞内的rDNA转录^[23]。而且, 营养剥夺和雷帕霉素(mTORC1抑制剂)均可通过抑制TP53INP2的核仁定位, 进而抑制细胞内rDNA的转录^[23,24], 表明TP53INP2的核仁定位可用来指示细胞内rDNA的转录活性。基于此发现, 我们构建了稳定表达GFP-TP53INP2的HeLa细胞, 用于筛选潜在的rDNA转录抑制药物^[24]。在富含营养物质的培养条件下, 我们发现, 和姜黄素类似^[24], 亚精胺可以显著抑制GFP-TP53INP2的核仁定位(图1(a))。亚精胺可导致大约70%的细胞中细胞核定位的GFP-TP53INP2移位至细胞质中(图1(b))。以上数据表明, 亚精胺能够有效抑制GFP-TP53INP2的核仁定位, 提示亚精胺可能影响细胞内rDNA的转录活性。

2.2 亚精胺抑制细胞内rDNA转录

为了探究亚精胺在rDNA转录中的作用, 我们首先

利用荧光定量PCR实验检测了细胞内前体rRNA 47S rRNA的水平。实验结果显示, 与已知的rDNA转录抑制剂雷帕霉素和姜黄素一样^[24], 亚精胺显著降低了细胞内47S rRNA的水平(图2(a))。此外, 利用亚精胺处理细胞, 随着处理时间的延长, 细胞内47S rRNA的水平随之逐渐降低(图2(b))。利用更低浓度的亚精胺(10 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞, 亚精胺仍然可以有效降低细胞内47S rRNA的水平(图2(c))。值得注意的是, 亚精胺处理24 h后, 细胞内47S rRNA的水平有一定的恢复(图2(c)), 提示细胞可能通过较长时间的代谢逐渐消除亚精胺的抑制作用。5-FUrd作为尿嘧啶的类似物, 可掺入细胞内新合成的RNA中。因此, 利用免疫荧光染色实验检测5-FUrd的掺入量, 可用来指示细胞内新生RNA的合成情况^[25]。我们发现, 利用亚精胺处理细胞, 细胞内核仁处5-FUrd的信号显著减弱(图2(d), (e)), 表明细胞内核仁处47S rRNA的生成受到抑制。此外, 利用RNA印记实验直接检测细胞内47S rRNA的含量, 得到了与以上发现一致的实验结果(图2(f), (g))。

2.3 亚精胺抑制mTORC1活性

mTORC1是细胞内rDNA转录和蛋白翻译的主要上游调控信号之一^[26,27]。为了检测亚精胺能否通过影响mTORC1的活性调控rDNA转录, 我们检查了蛋白S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1)在389位点的苏氨酸(Thr389)的磷酸化水平, 该位点的磷酸化由

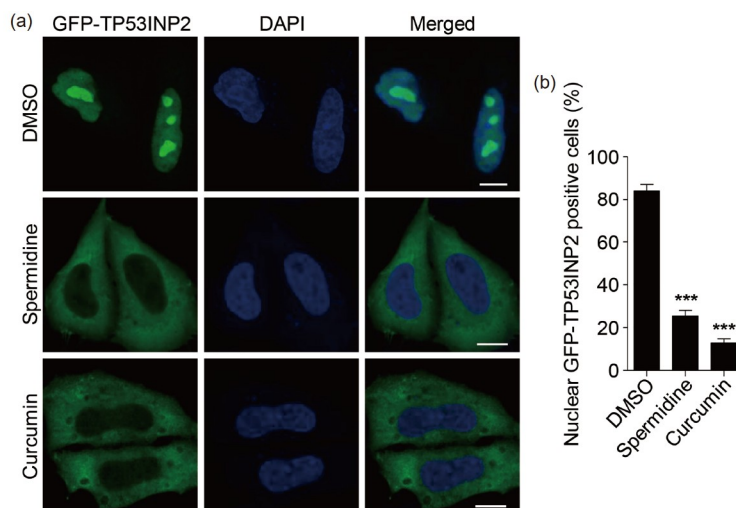


图 1 (网络版彩色)亚精胺抑制细胞内GFP-TP53INP2的核仁定位。(a) 利用亚精胺或者姜黄素处理稳定表达GFP-TP53INP2的HeLa细胞3 h, 然后利用激光共聚焦显微镜观察GFP-TP53INP2的亚细胞定位。标尺, 10 μm 。(b) 统计(a)中GFP-TP53INP2定位于细胞核内的细胞比例。*** $P<0.001$

Figure 1 (Color online) Spermidine abolishes the nucleolar localization of GFP-TP53INP2. (a) Subcellular localization of GFP-TP53INP2 in HeLa cells stably expressing GFP-TP53INP2. The cells were treated with spermidine or curcumin for 3 h. Scale bars, 10 μm . (b) Statistical analysis of cells with nuclear distribution of GFP-TP53INP2 treated as in (a). *** $P<0.001$

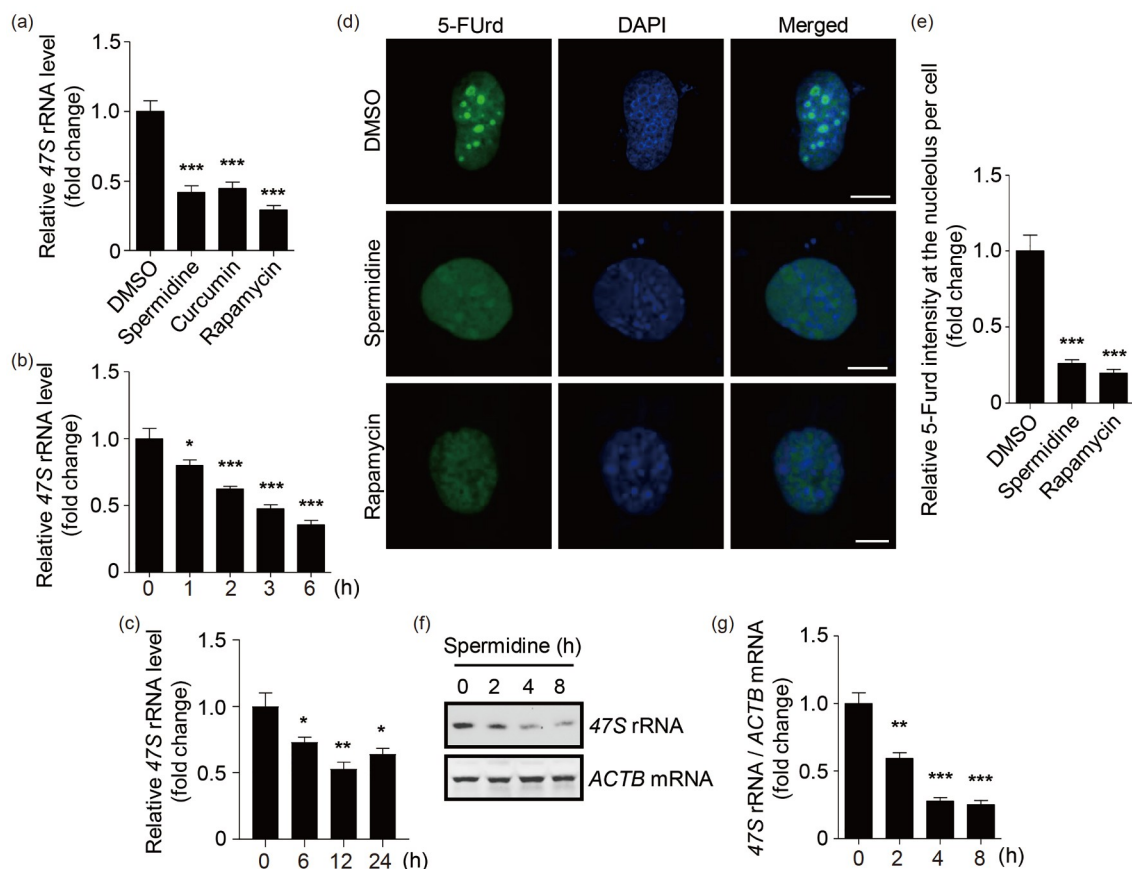


图 2 (网络版彩色)亚精胺抑制细胞内rDNA转录. (a) 利用亚精胺、姜黄素或者雷帕霉素处理HeLa细胞, 利用荧光定量PCR实验检测细胞内47S rRNA的含量. (b) 利用亚精胺处理细胞不同的时间, 检测细胞内47S rRNA的含量. (c) 利用低浓度亚精胺(10 μmol/L)处理细胞不同的时间, 检测细胞内47S rRNA的含量. (d) 利用亚精胺或者雷帕霉素处理细胞3 h, 利用5-FUrd掺入实验检测核仁处47S rRNA的合成情况. 标尺, 10 μm. (e) 统计(d)中细胞核仁处5-FUrd的荧光强度. (f) 利用亚精胺处理细胞不同的时间, 提取细胞内的总RNA, 利用RNA印记实验检测47S rRNA的含量. (g) 统计(f)中47S rRNA的含量. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 2 (Color online) Spermidine inhibits rDNA transcription. (a) 47S rRNA level in HeLa cells analyzed by real-time PCR. The cells were treated with spermidine, curcumin or rapamycin. (b) 47S rRNA level in cells treated with spermidine for the indicated time. (c) 47S rRNA level in cells treated with low-dose spermidine (10 μmol/L). (d) 47S rRNA synthesis at the nucleolus was indicated by 5-FUrd incorporation in cells treated with spermidine or rapamycin. Scale bars, 10 μm. (e) Statistical analysis of the fluorescence intensity of 5-FUrd at the nucleolus in (d). (f) Total RNA in cells was isolated and 47S rRNA level was analyzed by northern blot. The cells were treated with spermidine for the indicated time. (g) Statistical analysis of 47S rRNA level in (f). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

mTORC1特异性介导. 实验结果显示, 与雷帕霉素和姜黄素类似^[24], 亚精胺也可显著降低细胞内S6K1的磷酸化水平(图3(a), (b)). 值得注意的是, 随着亚精胺处理时间的延长, 细胞内S6K1的磷酸化水平随之逐渐下降(图3(c), (d)). 此外, 我们发现低浓度亚精胺(10 μmol/L)也可降低细胞内S6K1的磷酸化水平(图3(e), (f)). 然而, 更低浓度的亚精胺(1 μmol/L)对于S6K1的磷酸化水平没有显著影响(图3(e), (f)). 近年的一项研究揭示, 亚精胺可通过激活磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)抑制mTORC1的活性^[28]. 然而, 亚精胺如何抑制AMPK的活性并不清楚. 多项研究发现,

乙酰转移酶p300可通过乙酰化mTORC1的亚基Raptor (regulatory-associated protein of mTOR)提高mTORC1的活性^[29-31]. 有趣的是, 亚精胺可通过抑制p300的活性诱导自噬^[32]. 我们推测, 亚精胺可能通过降低p300介导的Raptor的乙酰化抑制mTORC1的活性. 与我们的预期一致, 亚精胺可显著抑制Raptor的乙酰化(图3(g), (h)). 值得注意的是, 极低浓度的亚精胺(1 μmol/L)仍然表现出一定的抑制作用(图3(g), (h)). 相较于mTORC1, 亚精胺对于p300的抑制作用似乎更为显著. 总之, 以上结果表明, 亚精胺能够抑制细胞内mTORC1的活性, 且这种抑制作用可能部分通过降低p300介导的Raptor的乙酰化实现.

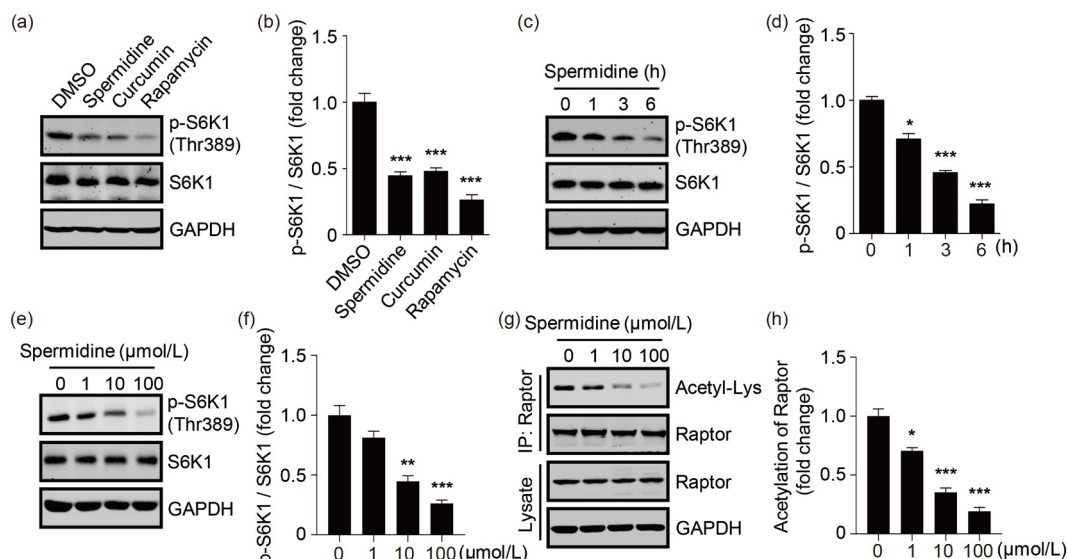


图 3 (网络版彩色)亚精胺抑制细胞内mTORC1的活性. (a) 利用亚精胺、姜黄素或者雷帕霉素处理细胞, 利用蛋白免疫印迹实验检测细胞内mTORC1底物S6K1在389位点的苏氨酸的磷酸化水平. (b) 统计(a)中S6K1的磷酸化水平. (c) 利用亚精胺处理细胞不同的时间, 检测细胞内S6K1在389位点的苏氨酸的磷酸化水平. (d) 统计(c)中S6K1的磷酸化水平. (e) 利用不同浓度的亚精胺处理细胞6 h, 检测细胞内S6K1在389位点的苏氨酸的磷酸化水平. (f) 统计(e)中S6K1的磷酸化水平. (g) 利用不同浓度的亚精胺处理细胞6 h, 检测Raptor的乙酰化水平. (h) 统计(g)中Raptor的乙酰化水平. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Figure 3 (Color online) Spermidine decreases mTORC1 activity. (a) p-S6K1 (Thr389) level in cells analyzed by western blot. The cells were treated with spermidine, curcumin or rapamycin. (b) Statistical analysis of p-S6K1 (Thr389) level in (a). (c) p-S6K1 (Thr389) level in cells treated with spermidine for the indicated time. (d) Statistical analysis of p-S6K1 (Thr389) level in (c). (e) p-S6K1 (Thr389) level in cells treated with spermidine with different concentrations for 6 h. (f) Statistical analysis of p-S6K1 (Thr389) level in (e). (g) Acetylation of Raptor in cells treated with spermidine with different concentrations for 6 h. (h) Statistical analysis of Raptor acetylation level in (g). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

2.4 亚精胺抑制蛋白合成和细胞增殖

细胞内的rDNA转录是核糖体生物发生的关键限速步骤, 也是蛋白合成和细胞增殖的重要前提. 为了探究亚精胺的生理作用, 我们首先利用基于点击化学的实验方法检测细胞内新生蛋白的生成速率^[25]. 与雷帕霉素和姜黄素一样, 亚精胺显著降低细胞内新生蛋白的生成速率(图4(a)). 此外, 我们检测了亚精胺对细胞增殖的影响. 我们发现, 用亚精胺处理细胞, 细胞数量的增加速率明显降低(图4(b)). 与此同时, 亚精胺对细胞的存活没有显著影响(图4(c)), 表明亚精胺不是通过影响细胞死亡调控细胞的数量. 综上所述, 这些数据表明, 亚精胺能够抑制蛋白合成和细胞增殖, 这与亚精胺在细胞内rDNA转录中的抑制作用一致.

3 讨论

本研究发现亚精胺是一种新型的rDNA转录天然抑制剂, 为亚精胺的抗癌作用提供了新的分子机制. 研究结果提示, 筛选抑制rDNA转录活性的新型分子是开

发潜在抗癌药物的一个富有前景的方向.

实验结果表明, 抑制mTORC1的活性可能是亚精胺影响细胞内rDNA转录活性的重要机制. 然而, 亚精胺通过何种机制调控mTORC1的活性不甚明确. 既往的研究发现, 亚精胺可抑制乙酰转移酶p300的活性^[32], 而p300则可通过乙酰化mTORC1的重要亚基Raptor促进mTORC1的激活^[29-31]. 实验结果显示, 亚精胺可显著降低细胞内Raptor的乙酰化水平, 表明亚精胺可能通过抑制p300介导的Raptor乙酰化调控mTORC1的活性. 此外, 亚精胺也有可能通过细胞内其他的机制影响mTORC1的活性. 最近的一项研究发现, 亚精胺可通过激活AMPK进而抑制mTORC1^[28]. 然而, 亚精胺如何激活AMPK仍有待未来的研究予以阐明.

多项研究发现, 在多种不同的物种中, 亚精胺可通过诱导自噬延缓衰老、延长寿命^[15-17,33]. 然而, 亚精胺通过哪些机制影响自噬仍然有待研究. 此外, 除了诱导自噬, 亚精胺是否可通过影响其他的生物学过程延缓衰老、延长寿命也不明确.

值得注意的是, 与姜黄素类似, 亚精胺也是通过抑

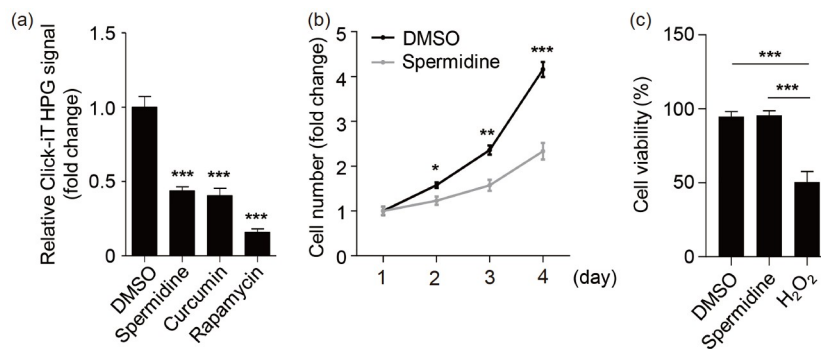


图 4 (网络版彩色)亚精胺抑制蛋白合成和细胞增殖. (a) 利用亚精胺、姜黄素或者雷帕霉素处理细胞, 利用基于点击化学的实验方法检测细胞内新生蛋白的含量. (b) 利用亚精胺处理细胞不同的时间, 检测细胞的数量变化情况. (c) 利用亚精胺或者H₂O₂处理细胞, 检测细胞的存活情况. H₂O₂处理细胞作为阳性对照. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 4 (Color online) Spermidine suppresses protein synthesis and cell proliferation. (a) Nascent proteins in cells were detected using a Click-iT HPG method. The cells were treated with spermidine, curcumin or rapamycin. (b) Relative cell number of cells treated with spermidine for the indicated time. (c) Cell viability was examined in cells treated with spermidine or H₂O₂. H₂O₂ treatment was used as a positive control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

制mTORC1的活性, 诱导自噬起始的同时抑制rDNA转录^[24]. 自噬是细胞内重要的分解代谢途径, 而核糖体生物发生则是细胞内最耗能的合成代谢途径, 二者均受到mTORC1的调控. 因此, 靶向调控mTORC1活性的药物, 抑制rDNA转录的同时也会诱导自噬的起始, 进而

协调细胞的合成代谢和分解代谢途径. 除了mTORC1信号, 细胞内存在多种调控rDNA转录活性的信号通路^[5]. 亚精胺是否能通过调控细胞内其他的信号通路影响rDNA的转录活性并不清楚, 仍然有待于未来进一步的研究予以揭示.

参考文献

- Shore D, Albert B. Ribosome biogenesis and the cellular energy economy. *Curr Biol*, 2022, 32: 611–617
- Leary D J, Huang S. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett*, 2001, 509: 145–150
- Thomson E, Ferreira-Cerca S, Hurt E. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *J Cell Sci*, 2013, 126: 4815–4821
- Catez F, Dalla Venezia N, Marcel V, et al. Ribosome biogenesis: An emerging druggable pathway for cancer therapeutics. *Biochem Pharmacol*, 2019, 159: 74–81
- Drygin D, Rice W G, Grummt I. The RNA polymerase I transcription machinery: An emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010, 50: 131–156
- Pelletier J, Thomas G, Volarević S. Ribosome biogenesis in cancer: New players and therapeutic avenues. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 51–63
- Claypool J A, French S L, Johzuka K, et al. Tor pathway regulates Rm3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 946–956
- Mayer C, Zhao J, Yuan X, et al. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev*, 2004, 18: 423–434
- Zhao J, Yuan X, Frödin M, et al. ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol Cell*, 2003, 11: 405–413
- Arabi A, Wu S, Ridderstråle K, et al. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 303–310
- Ciaramatori S, Scott P H, Sutcliffe J E, et al. Overlapping functions of the pRb family in the regulation of rRNA synthesis. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 5806–5814
- Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins Z A, et al. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 311–318
- Treré D, Ceccarelli C, Montanaro L, et al. Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52: 1601–1607
- Zhai W, Comai L. Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 5930–5938

- 15 Eisenberg T, Abdellatif M, Schroeder S, et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat Med*, 2016, 22: 1428–1438
- 16 Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, et al. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 1305–1314
- 17 Yue F, Li W, Zou J, et al. Spermidine prolongs lifespan and prevents liver fibrosis and hepatocellular carcinoma by activating MAP1S-mediated autophagy. *Cancer Res*, 2017, 77: 2938–2951
- 18 Wu H Y, Wang J N, Jiang H Y, et al. The association of dietary spermidine with all-cause mortality and CVD mortality: The US national health and nutrition examination survey, 2003 to 2014. *Front Public Health*, 2022, 10: 949170
- 19 Kiechl S, Pechlaner R, Willeit P, et al. Higher spermidine intake is linked to lower mortality: A prospective population-based study. *Am J Clin Nutr*, 2018, 108: 371–380
- 20 Fan J, Feng Z, Chen N. Spermidine as a target for cancer therapy. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104943
- 21 Madeo F, Eisenberg T, Pietrocola F, et al. Spermidine in health and disease. *Science*, 2018, 359: eaan2788
- 22 Zimmermann A, Hofer S J, Madeo F. Molecular targets of spermidine: Implications for cancer suppression. *Cell Stress*, 2023, 7: 50–58
- 23 Xu Y, Wan W, Shou X, et al. TP53INP2/DOR, a mediator of cell autophagy, promotes rDNA transcription via facilitating the assembly of the POLR1/RNA polymerase I preinitiation complex at rDNA promoters. *Autophagy*, 2016, 12: 1118–1128
- 24 Xu Y, Wu Y, Wang L, et al. Identification of curcumin as a novel natural inhibitor of rDNA transcription. *Cell Cycle*, 2020, 19: 3362–3374
- 25 Xu Y, Wu Y, Wang L, et al. Autophagy deficiency activates rDNA transcription. *Autophagy*, 2022, 18: 1338–1349
- 26 Mayer C, Grummt I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene*, 2006, 25: 6384–6391
- 27 Ma X M, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 307–318
- 28 Yan J, Yan J, Wang Y, et al. Spermidine-enhanced autophagic flux improves cardiac dysfunction following myocardial infarction by targeting the AMPK/mTOR signalling pathway. *Br J Pharmacol*, 2019, 176: 3126–3142
- 29 He A, Chen X, Tan M, et al. Acetyl-CoA derived from hepatic peroxisomal β -oxidation inhibits autophagy and promotes steatosis via mTORC1 activation. *Mol Cell*, 2020, 79: 30–42.e4
- 30 Son S M, Park S J, Lee H, et al. Leucine signals to mTORC1 via its metabolite acetyl-coenzyme A. *Cell Metab*, 2019, 29: 192–201.e7
- 31 Son S M, Park S J, Stamatakou E, et al. Leucine regulates autophagy via acetylation of the mTORC1 component raptor. *Nat Commun*, 2020, 11: 3148
- 32 Pietrocola F, Lachkar S, Enot D P, et al. Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death Differ*, 2015, 22: 509–516
- 33 Morselli E, Mariño G, Bennetzen M V, et al. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J Cell Biol*, 2011, 192: 615–629

Summary for “亚精胺抑制核糖体DNA转录”

Spermidine inhibits rDNA transcription

Yinfeng Xu^{1*} & Wei Wan^{2*}¹ Laboratory of Basic Biology, Hunan First Normal University, Changsha 410205, China;² Department of Biochemistry, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China* Corresponding authors, E-mail: yinfeng_xu0824@126.com; wanwei@zju.edu.cn

Ribosome, composed of ribosomal RNAs (rRNAs) and ribosomal proteins, is the only organelle in the cell for protein synthesis. As the structural molecules, rRNAs transcribed from ribosomal DNA (rDNA) make up over half of the mass of the ribosome. There are millions of ribosomes in every single mammalian cell. To meet the huge demand for the production of rRNAs, the genes of rDNA in the genome are highly repetitive and contain hundreds to thousands of copies. The production of rRNAs is a multi-stage process, including synthesis, processing and modifications, among which rDNA transcription at the nucleolus is one of the key rate-limiting steps. In normal cells, rDNA transcription is tightly controlled by nutrient-sensing pathways, such as mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and AMP-activated protein kinase (AMPK), linking rDNA transcription activity to nutrient availability. By contrast, in cancer cells, various mechanisms, such as activation of oncogenes, inactivation of tumor suppressors, and dysregulation of nutrient-sensing pathways, help cancer cells bypass the restriction of nutrients and result in the hyperactivation of rDNA transcription. Importantly, the hyperactivation of rDNA transcription is required for cancer cells to support their sustainable upregulated growth and proliferation. Intervention of the hyperactivation of rDNA transcription in cancer cells has emerged as a promising strategy for anticancer therapy.

Previously, we reported that tumor protein p53 inducible nuclear protein 2 (TP53INP2) at the nucleolus promotes rDNA transcription by driving the assembly of the RNA polymerase I preinitiation complex at the rDNA promoter region. Interestingly, nucleolar localization is required for TP53INP2 to stimulate rDNA transcription, suggesting that the nucleolar localization of TP53INP2 can be used as an indicator of rDNA transcription activity in the cell. In this study, we showed that treatment of the cells with spermidine, a naturally occurring polyamine, can markedly eliminate the nucleolar localization of TP53INP2. Consistent with this observation, we found that spermidine treatment suppresses cellular rDNA transcription and leads to a significant reduction of the precursor rRNA transcript 47S rRNA. Mechanistically, spermidine inhibits the activity of cellular mTORC1, the master upstream activator of rDNA transcription, through a mechanism that is partially dependent on the decrease of the acetylation of regulatory-associated protein of mTOR (Raptor), the necessary subunit of mTORC1. Functionally, spermidine suppresses protein synthesis and cell proliferation. Taken together, our findings identify spermidine as a novel inhibitor of rDNA transcription and suggest that the inhibition of rDNA transcription may be an important mechanism by which spermidine exerts its anticancer effect.

Of note, spermidine has been reported to activate AMPK to inhibit mTORC1. There seem to be several different mechanisms utilized by spermidine to regulate mTORC1 activity. It is noteworthy that spermidine supplementation has been demonstrated to modulate aging, extend lifespan, and ameliorate aging-related diseases in various animal models, including worms, flies, and mice. It would be interesting to investigate whether the inhibition of rDNA transcription is one of the mechanisms through which spermidine exerts its anti-aging effect.

cancer, mTORC1, rDNA transcription, ribosome biogenesis, spermidinedoi: [10.1360/TB-2024-0037](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0037)